



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Gebrauchsmuster**
⑩ **DE 295 12 719 U 1**

⑤① Int. Cl.⁸:
C07 K 16/00
A 61 K 39/395
C 12 N 5/18
G 01 N 33/577
// C12Q 1/28

⑪	Aktenzeichen:	295 12 719.8
②②	Anmeldetag:	28. 7. 95
④7	Eintragungstag:	29. 8. 96
④3	Bekanntmachung im Patentblatt:	10. 10. 96

⑦3 Inhaber:
Sabat, Robert, 10245 Berlin, DE; Seifert, Martina,
Dr.rer.nat., 10435 Berlin, DE; Marx, Uwe, Dr.med.,
12629 Berlin, DE; Glaser, Ralf, Dr.rer.nat., 10178
Berlin, DE; Volk, Hans-Dieter, Prof.Dr.med., 10178
Berlin, DE

⑦4 Vertreter:
Wehlan, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 10247
Berlin

⑤4 Monoklonale Antikörper gegen humanes Interleukin-10

DE 295 12 719 U 1

DE 295 12 719 U 1

Monoklonale Antikörper gegen humanes Interleukin-10

Beschreibung

Die Erfindung betrifft neue Hybridom-Zelllinien und davon abgeleitete monoklonale Antikörper (mAK), die gegen verschiedene Epitope des humanen Interleukin-10 (hIL-10) gerichtet sind, die Wirkung dieses Zytokins inhibieren und dessen Konformation ändern. Die Erfindung betrifft weiterhin Fab-Fragmente, Chimäre und Konjugate dieser mAK sowie Arzneimittel, die als Wirkstoffe diese mAK oder ihre Derivate enthalten.

Interleukin-10, ursprünglich als Zytokin Synthese hemmender Faktor - cytokine synthesis inhibitory factors, CSIFs (US-Patent) 5231 012) bezeichnet - das von T-Helfer-2-Zellen gebildet wird und bei murinen T-Helfer-1-Zellen die Synthese von Zytokinen hemmt (Fiorentino, D.F. et al., 1989, J. Exp. Med. 170:2081), ist einer der wesentlichen Mediatoren des Immunsystems. Die Gene für hIL-10 sind auf dem Chromosom 1 lokalisiert (Kim, J. M. et al., 1992, Immunol. 148:3618). Das Zytokin zeigt eine hohe Homologie mit einem - Epstein-Barr-Virus (EBV) kodierten - Protein, dem BCRF1 (Moore, K.W. et al., 1990, Science 248:1230). Humanes Interleukin-10 ist ein Dimer aus zwei identischen, nicht-kovalent gebundenen Untereinheiten. Jede dieser Einheiten besteht aus 178 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 18,6 kDa und kann am N-terminalen Ende glykosyliert sein. Die Glykosylierung scheint keinen wesentlichen Einfluß auf die biologische Wirkung zu haben. Bei Menschen wird hIL-10 durch die aktivierten T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Makrophagen und Keratinozyten synthetisiert und sezerniert. Diese beiden Prozesse können durch humanes Interleukin-4 (hIL-4) und humanes Interferon-g (hIFN-g) inhibiert werden. Humanes Interleukin-10 ist ein pleiotropes Zytokin mit immunsuppressiven und immunstimulierenden Eigenschaften. Es besitzt einen starken Effekt auf die Morphologie, Funktion und die Zytokinproduktion bei menschlichen Monozyten und Makrophagen. Humanes Interleukin-10 hemmt die Synthese proinflammatorischer Proteine, wie TNF- α , TNF- β , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF (Fiorentino, D. E. et al., 1991, J. Immunol. 146:3815) und verstärkt die Expression des Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten als einem der antinflammatorischen Faktoren (de Waal, M. R. et al., 1992, Curr. Opin. Immunol. 4:314). Weiterhin supprimiert es die Synthese von Superoxiden, Nitrogenen und oxygenierenden Metaboliten, senkt die Expression von Major Histocompatibility Complexes, MHC-Klasse-2-Molekülen und wirkt deaktivierend auf Monozyten und Makrophagen. Humanes Interleukin-10 hemmt die antigenabhängige T-Zell-Proliferation, die Zytokinsynthese bei Peripheren Mononukleären Blutzellen (PBMNC), Natürlichen-Killer-Zellen (NK-Zellen) (Yseel, H. et al., 1991, Exp. Med. 174:953) und bei T-Helfer-1-Zellen, insbesondere die Synthese von IFN-g. Im Gegensatz dazu wirkt es immunstimulierend auf B-Zellen und kann bei ihnen die Proliferation, die Sekretion der Immunglobuline und die verstärkte Expression von Molekülen des (MHC) Klasse-2 bewirken (Howard, M. et al., 1992, J. Clin. Immunol. 12:239). Bei Anwesenheit von IL-2 und IL-4 stimuliert es Thymozyten (Suda, T. et al., 1990, Cell. Immunol. 129:228).

Die Verwendung von Interleukin-10 zur Herstellung von Arzneimitteln mit tumorhemmender Wirksamkeit ist Gegenstand des Patents DE 4122 402 (1993; Diamantstein, T.; Richter, G.; Blankenstein, Th.).

Interleukin-10 wird gegenwärtig als das wichtigste immunsuppressive Zytokin des menschlichen Organismus angesehen.

Seit der ersten Beschreibung durch Köhler G. und Milstein C. (1975, Nature 256:495) sind zahlreiche monoklonale Antikörper gegen unterschiedlichste Antigene produziert worden. Monoklonale Antikörper, wie in der vorliegenden Erfindung, sind in sich homogene Immunglobuline einer Spezifität, die von einem Hybridom in vitro in großen Mengen produziert werden. Hybridome stellen dabei das Verschmelzungsprodukt einer Milzzelle, die in der Kultur nicht überlebensfähig ist und einer permanent wachsenden Myelomzelle (Tumoren von B-Lymphozyten) dar (Hämmerling, U., Eur. J. Immunol. 1.7 743, 1974; J. H. et al., Monoklonal Antikörper, Springer Verlag, 1988).

Es sind auch zahlreiche mAK bekannt, die gegen Interleukine (IL) gerichtet sind, z.B. gegen IL-2 (US 4845 198, 5104 652; DE 3815 472) oder gegen NAP (Neutrophilen aktivierendes Peptid) / IL-8, DE 3928 861).

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, zunächst Hybridom-Zelllinien zu entwickeln, die die monoklonalen Antikörper gegen humanes Interleukin-10 erzeugen, daraus in nachfolgenden Verfahrensschritten diese monoklonalen Antikörper zu gewinnen, zu reinigen, zu charakterisieren, zu modifizieren sowie daraus geeignete Mittel zur Prophylaxe, Therapie und Diagnose Interleukin-10-abhängiger Erkrankungen bei Menschen, zur Immunmodulierung von humanem Interleukin-10-abhängigen Prozessen in vivo und in vitro, zur Reinigung und quantitativen Bestimmung von humanen Interleukin-10 und zu experimentellen Zwecken herzustellen.

Die Aufgabe wurde erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß murine Myelomzellen mit den Milzzellen einer gegen humanes Interleukin-10 immunisierten Maus fusioniert wurden (Beispiel 2). Die Vereinigung der Zellmembranen führt zu einer Durchmischung der Chromosomen und der Erbinformation der beiden Zelltypen. Myelomzellen stellen entartete Zellen dar, die von B-Lymphozyten abstammen und permanent in Gewebekulturen wachsen. Heute verfügbare Myelom-Zelllinien haben durch Mutation die Fähigkeit zur eigenen Antikörperproduktion verloren. Weiterhin weisen diese Zellen eine Enzymmangelmuation im DNA-Syntheseweg auf, welche bewirkt, daß sie in einem Selektionsmedium (Kulturmedium unter Zusatz von Hypoxantin, Aminopterin und Thymidin (HAT)) nicht überleben können. Eine in dieser Hinsicht gut verwendbare Zelllinie ist die Balb/c-Maus Myelom-Zelllinie SP2/0-Agt14 (ATCC CRL 8287) (Shulman et al. 1978), Kurzbezeichnung SP2/0. Die Milzen der immunisierten Tiere (weibliche Balb/c-Mäuse) werden unter aseptischen Bedingungen entnommen und durch mechanische Zerkleinerung der Organe die darin enthaltenen antikörperproduzierenden Zellen gewonnen, wie von Hämmerling U. (1974, Eur. J. Immunol. 1,7 743) beschrieben. Diese Zellen zeichnen sich dadurch aus, daß sie Antikörper synthetisieren und sezernieren, unter anderem auch die gewünschten anti-Interleukin-10-Antikörper. Die Milzzellen sind jedoch nur über eine kurze Zeit lebensfähig, produzieren Antikörper nur in geringeren Konzentrationen, die zusätzlich durch andere Zellen und deren Produkte verunreinigt sind. Durch die Verschmelzung von Myelomzellen und antikörperproduzierenden Zellen lassen sich deren Eigenschaften vorteilhaft vereinigen. Man erhält Hybridome, die in Zellkulturen permanent wachsen und Antikörper der gewünschten Spezifität in großen Mengen produzieren.

Die genetische Verwandtschaft von Balb/c-Myelomzellen und Balb/c-antikörperproduzierenden Zellen führt zu stabilen Verschmelzungsprodukten. Die Hybridome, welche durch die Verschmelzung entstehen, werden in einem Selektionsmedium kultiviert, in dem nur sie überleben können, da die Enzymmangelmuation der Myelomzellen durch die Erbinformation der Milzzelle ausgeglichen wird. Myelomzellen selbst und die nicht verschmolzenen Milzzellen sterben ab. Nur ein Teil der erzielten Hybridome produziert Antikörper gegen humanes Interleukin-10. Solche Verschmelzungsprodukte müssen durch die Klonierung und zahlreiche Reklonierungen isoliert werden, um einzelne Klone zu erhalten, die stabil und in großen Mengen mAK produzieren. Ein Klon stellt dabei definitionsgemäß die Gesamtheit der Tochterzellen einer Ursprungszelle dar, d. h. alle diese Zellen sind genetisch und phänotypisch identisch. Diese Zellen, auch als Hybridom-Zelllinien bezeichnet, werden unter aseptischen Bedingungen in sterilen Gewebekulturen unter Verwendung entsprechender Nährmedien kultiviert. Auf allen Etappen der Herstellung wurden verschiedene Testmethoden zum Nachweis der Spezifität der Antikörper eingesetzt. Der erfindungsgemäße Nachweis von im Zellkulturüberstand enthaltenen anti-Interleukin-10-Antikörpern wird mit einem selbst entwickelten ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) durchgeführt (Beispiel 1). Diese spezifischen Antikörper werden nach deren Bindung an humanes Interleukin-10, das an Plastikplatten immobilisiert wurde, durch gegen Maus-Immunglobuline gerichtetes Antiserum erkannt. Dieses ist mit einem Enzym, z.B. Peroxidase, gekoppelt, das im positiven Fall durch die Reaktion mit dem Substrat eine Farbreaktion bewirkt. Entsprechend kann die Reaktivität der Antikörper mit anderen Proteinen getestet werden (Beispiel 4). Die neuen Hybridom-Zelllinien H-CB/RS/... und die durch sie produzierten monoklonalen Antikörper CB/RS/... wurden in 6 Gruppen (A bis F) eingeteilt und mit

- A: CB/RS/1E4, CB/RS/3H4, CB/RS/8B12
- B: CB/RS/5C8, CB/RS/5E2, CB/RS/6D10, CB/RS/6D11,
CB/RS/7F8, CB/RS/8F7, CB/RS/8B3
- C: CB/RS/7G5, CB/RS/7H4
- D: CB/RS/6F6
- E: CB/RS/5H7
- F: CB/RS/8A7

bezeichnet. Die monoklonalen Antikörper aus den Gruppen : A, B, C, D, E innerhalb einer dieser Gruppe binden das gleiche, für jede dieser Gruppen charakteristischen Interleukin-10-Epitop, welches räumlich getrennt von den Epitopen liegt, die durch die mAK CB/SR/8A7 (Gruppe F) erkennt ein nicht genau lokalisierbares Interleukin-10-Epitop (Beispiel 8). Alle in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Hybridom-Zelllinien können in vitro über lange Zeit in Kulturgefäßen unterschiedlicher

Größe, von kleinen Kulturflaschen bis zu Fermentertanks und Bioreaktoren gehalten werden und eignen sich für die Massenproduktion von mAK, welche aus Kulturüberständen dieser Klone (Hybridom-Zelllinien) gewonnen werden. Die mAK können im ungereinigten Kulturüberstand oder nach der Konzentrierung über die Tangentialflußdruckfilteranlage und gereinigt durch Aussalzen oder durch chromatische Verfahren verwendet werden (Beispiel 2).

Durch die Verfügbarkeit von in der vorliegenden Erfindung beschriebenen mAK gegen 4 verschiedene Interleukin-10-Epitope - der Gruppen A, B, C, D - ist es möglich, in biologischen Flüssigkeiten, wie Blut, Plasma, serösen Flüssigkeiten usw., die Konzentration des humanen Interleukin-10 zu bestimmen. Die zu messenden Proben werden auf Plastikplatten, die mit zwei epitopdifferenten anti-Interleukin-10-mAK vorbeschichtet wurden, inkubiert. Damit wird das Zytokin durch diese Antikörper auf der Plastikplatte gebunden. Der Nachweis des hIL-10 erfolgt darauf mit peroxidasemarkierten mAK, die zwei andere, gut zugängliche Epitope des Zytokins erkennen, dessen Bindung durch eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen wird. Die mAK als homogene Immunglobuline einer Spezifität in praktisch unbegrenzter Menge bieten erhebliche Vorteile gegenüber polyklonalen Antisera, welche in der Qualität chargenabhängig und quantitativ begrenzt verfügbar sind. Die Messung in einem mit mAK aufgebauten ELISA erlaubt die Bestimmung nur des von dem Antikörper erkannten Antigens, was die Spezifität des Tests erhöht. Die Verwendung einer Mischung aus zwei verschiedene Epitope erkennenden spezifischen monoklonalen Antikörpern für die Adsorption sowie für den Nachweis des hIL-10 erhöht sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität des Enzym-Immuno-Assays. Darüber hinaus kann nach dem gleichen Prinzip die quantitative Bestimmung des Zytokins mit einem Radio-Immuno-Assay durchgeführt werden.

Nach der Immobilisierung der beanspruchten anti-Interleukin-10-Antikörper aus den Gruppen A, B, C, D und F an geeigneten Trägermolekülen (z.B. aktivierte Gelmatrix) läßt sich eine Affinitätschromatographie durchführen, die die Reinigung von humanem Interleukin-10 aus verschiedenen Flüssigkeiten ermöglicht. Die Anwendung von spezifischen, verschiedene Interleukin-10-Epitope erkennenden, monoklonalen Antikörpern erhöht die Menge von gebundenem Zytokin an der Säule und die Spezifität der Reinigung. Danach muß die Säule mit einem neutralen Puffer gewaschen werden. Das hIL-10 wird mit 0,1 M Glyzipuffer mit dem pH-Wert 2,7 eluiert und anschließend elektrophoretisch auf Reinheit untersucht. Durch UV-Absorption bei 280 nm wird seine Konzentration bestimmt und seine Aktivität im biologischen Test gemessen.

Die Eigenschaft, Interleukin-10 zu neutralisieren, ermöglicht die Anwendung der in der vorliegenden Erfindung beschriebenen mAK aus der Gruppe A für verschiedene experimentelle Zwecke (Beispiel 9). Darüber hinaus sind mAK aus den Gruppen A, B, C, D und F als diagnostische Reagenzien geeignet, die einen Nachweis des humanen Interleukin-10 in Zellen und in Flüssigkeiten ermöglichen. Dadurch gelingt es, mit Hilfe dieser Antikörper Zellen zu identifizieren, die hIL-10 produzieren. Bei einer derartigen Anwendung wird einer dieser mAK an eine radioaktive, fluoreszierende oder andere farbgebende Substanz gekoppelt, oder aber man arbeitet mit einem zweiten markierten Antikörper, der spezifisch gegen Maus-Immunglobuline gerichtet ist.

Weiterhin sind die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper zur Herstellung von Chimären, deren konstanter Teil humanen Ursprungs (humanes Ig) und deren variabler, insbesondere der hypervariable Teil, muriner Herkunft ist, geeignet. Diese Chimären oder die in der Erfindung beschriebenen monoklonalen Antikörper - als homogene murine Antikörper - können als solche oder gekoppelt mit magnetischen Beads, radioaktiven Substanzen, Arzneimitteln oder eingekapselt in Liposomen zur Prophylaxe und Therapie Interleukin-10-abhängiger Erkrankungen beim Menschen eingesetzt werden. Dabei sind sie in so geringen Mengen wirksam, daß keine oder nur sehr schwache Nebenwirkungen während oder als Folge der Verabreichung auftreten. Die mAK, ihre Chimären oder Konjugate, welche die Eigenschaft, die biologische Aktivität von hIL-10 zu inhibieren, besitzen, können bei EBV verursachten Störungen, bei Lymphomen mit eigener hIL-10 Produktion oder bei Tumoren Einsatz finden. Sie eignen sich zur Verabreichung bei T-Zell-vermittelten Allergien, bei Autoimmunerkrankungen sowie nach Transplantationen.

Die Konformationsänderung von humanem Interleukin-10 nach der Bindung der in der vorliegenden Erfindung beschriebenen monoklonalen Antikörper an dieses Zytokin und gleichzeitig verstärkter oder verminderter Expression von anderen biologisch wichtigen Epitopen des hIL-10 ermöglicht die spezifische Immunmodulierung der von diesem Zytokin abhängigen Prozesse in vitro und in vivo (Beispiel 8).

Humanes Interleukin-10 wird nach der Bindung der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper an das Zytokin stabilisiert und vor dem Abbau durch proteolytische Enzyme geschützt, wodurch die biologische Halbwertszeit des humanen Interleukin-10 verlängert wird.

Die erfindungsgemäße Lösung besteht, neben der Herstellung monoklonaler Antikörper, die gegen humanes Interleukin-10 (a-IL-10-mAK) gerichtet sind, in der Gewinnung der die a-IL-10-mAK-produzierenden Hybridom-Zelllinien, die durch Verschmelzung der Milzzellen von mit humanem Interleukin-10 immunisierten Mäusen mit murinen Myelomzellen entstehen und aus denen nachfolgend a-hIL-10-mAK produzierende Klone isoliert und vermehrt werden. Es werden die Immunglobulinklassen IgA, IgD, IgE, IgM oder IgG-Subklassen IgG1, IgG2, IgG3 bzw. IgG4 produziert. Die monoklonalen Antikörper sind gekennzeichnet durch die Inhibierung der biologischen Aktivität des humanen Interleukin-10 nach Bindung dieser mAK an das Zytokin. Sie tragen zur Stabilisierung von hIL-10 und zur Verlängerung der biologischen Halbwertszeit des hIL-10 nach Bindung dieser mAK an das Zytokin bei. Ein entscheidendes Kennzeichen der mAK besteht darin, daß sie nach ihrer Bindung an humanes Interleukin-10 die Konformation dieses Zytokins ändern und mit der Konformationsänderung gleichzeitig eine bessere oder schlechtere Präsentation von verschiedenen Epitopen dieses Zytokins hervorrufen, wodurch hIL-10 durch Proteine / Peptide schneller oder langsamer erkannt wird und die biologische Wirkung von hIL-10 verstärkt oder abgeschwächt wird. Die mAK der Gruppen A bis F binden innerhalb einer Gruppe an das gleiche - für diese Gruppe charakteristische Epitop des hIL-10 binden, welches räumlich von den Epitopen der anderen Gruppen getrennt ist. Dabei bewirken mAK der Gruppen A und B eine Konformationsänderung des Zytokins bewirken mit dem Ergebnis, daß andere Epitope des hIL-10 besser oder schlechter präsentiert werden und dadurch die Geschwindigkeit verändert wird, mit der diese Epitope durch andere Proteine / Peptide erkannt werden. Die mAK der Gruppe C erkennen das Zytokin schneller, wenn ein mAK der Gruppe A oder B an das Zytokin gebunden wird. Die erfindungsgemäßen Chimären dieser mAK im konstanten Teil bestehen aus humanem Ig und im variablen, insbesondere im hypervariablen Teil, aus den beanspruchten monoklonalen Antikörpern gegen humanes Interleukin-10. Die Fab-Fragmente dieser mAK entstehen durch proteolytische Einwirkung von Papain im Verhältnis von 1:5 bis 1:15 zu dem jeweiligen mAK unter leicht reduzierenden Bedingungen im Gegenwart von Cystein in Konzentration von 5 bis 15 mM. Die Konjugate dieser mAK bestehen aus magnetischen Beads, radioaktiven Substanzen, Arzneimitteln, fluoreszierenden oder farbbildenden Substanzen und aus den monoklonalen Antikörpern gegen humanes Interleukin-10. In speziellen Ausführungsformen sind die monoklonalen Antikörper gegen humanes Interleukin-10, ihre Chimären, Konjugate oder Fab-Fragmente in Liposomen eingekapselt. Die monoklonalen Antikörper, ihre Fab-Fragmente, Chimären oder Konjugate lassen sich zur Diagnose, Prophylaxe und Therapie von Interleukin-10-abhängigen Erkrankungen sowie für Immunaффinitätssäulen verwenden. Sie dienen zur quantitativen Bestimmung von humanem Interleukin-10 in verschiedenen Flüssigkeiten in einem Sandwich-ELISA, Sie können zur Immunmodulierung von humanem Interleukin-10 abhängigen Prozessen verwendet werden. Beim Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum Nachweis mAK gegen hIL-10, ihrer Chimären, Konjugate und Fab-Fragmente werden 96-Well-Platten mit hIL-10 beschichtet, mit Rinder-Albumin in ELISA-Puffer geblockt, mit Waschpuffer gewaschen und so gelagert. Die zu testenden Proben werden in den Wells inkubiert, danach gewaschen, mit anti-Mausimmunglobulin-Peroxidase-gekoppelten-Antikörpern inkubiert, mit Waschpuffer gewaschen, die Wells mit Peroxidasesubstrat gefüllt, die enzymatische Reaktion mit Stopplösung beendet und die Absorption in einem Photometer gemessen wird. Das Testbesteck zur Bestimmung der a-hIL-10-mAK, ihrer Fab-Fragmente, Chimären und Konjugate besteht aus 96-Well-Platten, h-IL-10-Lösung in Carbonat / Bicarbonatpuffer, Rinder-Albumin-Lösung, ELISA-Puffer aus Na-Phosphat und NaCl mit pH 7,4, Waschpuffer aus ELISA-Puffer und Tween 20, anti-Mausimmunglobulin-Peroxidase-gekoppelten-Antikörper-Lösung, Peroxidasesubstrat-Lösung aus Orthophenodiamin, H₂O₂ und Na-Citrat mit pH 5,0, sowie aus einer Stopplösung, bestehend aus Schwefelsäure und Na-Sulfit.

Die Erfindung wird anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Enzym-Immuno-Assay zum Nachweis von anti-Interleukin-10-Antikörpern

Zum Nachweis von anti-hIL-10-mAK in den Kulturüberständen der Hybridomzellen sowie zum semi-quantitativen Vergleich der Antikörperproduktion verschiedener Klone wird erfindungsgemäß ein ELISA entwickelt. 96 Well-Platten werden über 24 Stunden bei 4°C mit 50 ml pro Napf coating solution (0,5 mg/ml humanes Interleukin-10 in 0,1 M Carbonat / Bicarbonatpuffer mit dem pH 9,6) beschichtet. Die Platten werden danach mit 100 ml pro Well 1%igem Rinder in ELISA-Puffer (0,01 M Na-Phosphat mit dem pH 7,4; 0,3 M NaCl) für 2 Stunden bei Raumtemperatur geblockt und 4 mal mit 150 µl pro Napf Waschpuffer (ELISA-Puffer; 0,1% v:v Tween 20) gewaschen. So vorbereitete ELISA-Platten können ohne Veränderungen der Sensitivität bei -22°C für ein Jahr gelagert werden. Um die nicht spezifische Reaktivität der mAK mit dem Plastikmaterial der Platten auszuschließen, wird für alle Platten eine Negativkontrolle gemessen, bei der die Platten anstatt mit hIL-10 zur Beschichtung nur mit 1%igem Rinder-Albumin in ELISA-Puffer inkubiert werden. 50 ml der zu testenden Hybridomüberstände pro Well werden für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 4 Waschschritten gibt man 50 ml pro Napf eines Ziege-anti-Maus-IgG-Peroxidasegekoppelten-Antikörpers (0,8 mg/ml), der mit dem Verdünnungspuffer (5% Gelifundol in Waschpuffer) 1:2000 verdünnt wird. Nach 1,5 Stunden Inkubation werden die Platten 4 mal gewaschen und mit 50 µl pro Well Peroxidasesubstrat (100 mM Na-Citrat mit dem pH 5,0; 5,5-mM OPD; 0,003 v:v-Wasserstoffperoxid) gefüllt. Die enzymatische Reaktion wird mit 50 µl pro Well Stopplösung (2 M Schwefelsäure, 0,05 M Natriumsulfit) gestoppt und die Absorption bei 492 nm in einem Plattenphotometer gemessen.

Beispiel 2

Immunisierung, Fusion, Klonierung und Gewinnung der monoklonalen Antikörper

Als Fusionspartner verwendete Zellen:

A) Die Myelomzellen der Balb/c-Maus Myelom-Zelllinie SP2/0-Agt14 (ATCC CRL 8287) (Shulman et al. 1978), Kurzbezeichnung SP2/0. Sie stellen entartete Zellen dar, die von B-Lymphozyten abstammen und permanent in Gewebekulturen wachsen. Diese Myelomzellen haben durch Mutation die Fähigkeit zur eigenen Antikörperproduktion verloren. Weiterhin haben sie eine Enzymmangelmutation im DNA-Syntheseweg, welche bewirkt, daß sie in einem Selektionsmedium nicht überleben können.

B) Die Milzzellen von den mit humanem Interleukin-10 (Recombinant Human Interleukin-10) immunisierten, 16 Wochen alten, weiblichen Balb/c-Mäusen. Die 6 Wochen alten, weiblichen Balb/c-Mäuse werden subcutan (s.c.) mit 50 mg und intraperitoneal (i.p.) mit 30 mg humanem Interleukin-10 in 100 µl 0,7% NaCl-Lösung immunisiert. 6 Wochen danach werden 40 mg dieses Antigens i.p. in 100 µl 0,7% NaCl Lösung injiziert. Nach 4 Wochen erhalten die Tiere i.p. den letzten Boost von 40 µg humanem Interleukin-10 in 100 µl 0,7% NaCl-Lösung.

Die Fusion wird nach Hämmerling U. (1974, Eur. J. Immunol. 1,7 743) 3 Tage nach der letzten Boosterung durchgeführt. Die Milzen der immunisierten Mäuse werden unter aseptischen Bedingungen entnommen und durch mechanische Zerkleinerung der Organe die darin enthaltenen antikörperproduzierenden Zellen gewonnen. Sie werden mit den murinen Myelomzellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, im Verhältnis 1:3 gemischt und in sterilem Basismedium (Iscove's DMEM / NUT MIX F-12) 3 mal gewaschen. Nach der Zentrifugation wird der Überstand dekantiert, die Zellen resuspendiert und von nun an bis zum Ende der Fusion durch Schwenken des Röhrchens in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Zellen werden in 1 ml sterilem, auf 37°C vorgewärmten Polyethylenglykol 4000 ausgedünnt, 1 Minute bei 37°C inkubiert und danach schrittweise mit Basismedium auf 30 ml verdünnt. Nach der Zentrifugation wird der Überstand dekantiert, die Hybridome resuspendiert und mit Kulturmedium (10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum in Basismedium) verdünnt. Sie werden dann in einer Dichte von $1,2 \times 10^5$ Zellen pro Napf in 96 Well-Platten ausgesät und in feuchter 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Die Platten werden am Tag zuvor mit 3×10^5 Maus-Peritoneal-Makrophagen als Feeder-Zellen pro Napf beschickt. Einen Tag nach der Fusion wird das Medium gegen Selektionsmedium (10 µM Hypoxanthin; 1,6 µM Thymidin; 0,4 µM Aminopterin in Kulturmedium) ausgetauscht. In solchem Medium können nur Verschmelzungsprodukte überleben, bei denen die Enzymmangelmutation der Myelomzellen durch die Erbinformation der Milzzelle ausgeglichen wird. Myelomzellen selbst und die nicht verschmolzenen Milzzellen sterben ab. 5 Tage danach werden 50% des Mediums durch frisches Selektionsmedium ersetzt; zum gleichen Zeitpunkt sind die ersten Klone sichtbar. Nach weiteren 4 Tagen werden die zellfreien Kulturüberstände (ZKÜ) zur Testung mit dem im Beispiel 1 beschriebenen ELISA auf die

B 26.10.95

Produktion der spezifischen Antikörper gegen hIL-10 entnommen. Von 792 getesteten ZKU's enthalten 33 Antikörper, die signifikant an hIL-10 binden. Die Hybridome, welche diese Antikörper produzieren, werden in 96 Well-Platten mit Maus-Peritoneal-Makrophagen in HT-Medium (KulturmEDIUM mit Zusatz von Hypoxantin und Thymidin) kloniert. Dabei wird die Hälfte der Platte mit statistisch 10 Zellen pro Napf, die andere Hälfte mit 1 Zelle pro Napf ausgesät. Das HT-Medium wird jeden zweiten Tag zu 50% ausgetauscht und nach 10 Tagen durch KulturmEDIUM ersetzt. Zellfreie Zellkulturüberstände werden regelmäßig mit dem im Beispiel 1 beschriebenen ELISA auf die Anwesenheit der spezifischen Antikörper gegen hIL-10 getestet. Die Hybridomkulturen, welche diese Antikörper produzieren, werden noch 4 mal mit der limiting dilution Technik rekloniert. Dabei werden die Zellen so verdünnt, daß statistisch 0.5 Zellen pro Well eingesetzt werden. Dadurch isoliert man einzelne Klone, die stabil und in hoher Quantität monoklonale Antikörper produzieren. Nach Klonierung und den Reklonierungen werden aus 33 primär positiven Kulturen 15 verschiedene Hybridom-Zelllinien etabliert. Sie werden in Flüssigstickstoff konserviert, unter aseptischen Bedingungen in sterilen Gewebekulturen unter Verwendung entsprechender Nährmedien kultiviert und produzieren dabei 15 neue, verschiedene anti-Interleukin-10-Antikörper. Die Hybridom-Zelllinien H-CB/RS/... und die durch sie produzierten monoklonalen Antikörper wurden als:

CB/RS/1E4,	CB/RS/3H4,	CB/RS/5C8,	CB/RS/5E2,
CB/RS/5H7,	CB/RS/6D10,	CB/RS/6D11,	CB/RS/6F6,
CB/RS/7G5,	CB/RS/7H4,	CB/RS/7F8,	CB/RS/8A7,
CB/RS/8B3,	CB/RS/8B12,	CB/RS/8F7	

bezeichnet.

Die Unterschiedlichkeit der 15 Hybridom-Zelllinien und der von ihnen erzeugten mAK beruht nicht allein auf der Tatsache, daß sie aus getrennten Primärkulturen entstammen, sondern auch auf Unterschieden im Isotyp, im isoelektrischen Punkt, in der Reaktion mit hIL-10, im Vermögen, die Aktivität des hIL-10 in biologischen Testsystemen zu inhibieren, im Epitop, das sie erkennen wie auch in der Kreuzreaktivität mit anderen Zytokinen und Antigenen.

Beispiel 3

Produktion, Reinigung, Peroxidasemarkierung und Herstellung von Fab-Fragmenten der monoklonalen Antikörper

10^6 Zellen einer in der Erfindung beschriebenen Hybridom-Zelllinie werden aus Flüssigstickstoff aufgetaut, im Basismedium gewaschen, mit 30 ml KulturmEDIUM verdünnt und in eine 260-ml-Zellkulturflasche überführt. Nach 3 Tagen sind die Zellen gut angewachsen. Die werden auf zwei Flaschen verteilt. Wenn sie eine Dichte von etwa 100 000 Zellen pro ml erreichen, werden sie aus beiden Flaschen suspendiert und in eine Rollerflasche überführt. Diese wird mit KulturmEDIUM auf 150 ml aufgefüllt. Die Zelldichte in der Rollerflasche wird alle zwei Tage kontrolliert, und es wird jeweils soviel KulturmEDIUM zugegeben, daß sie im Bereich zwischen 50 000 und 150 000 Zellen pro ml gehalten werden kann. Wenn das gewünschte Suspensionsvolumen erreicht ist, läßt man die Zellen ungestört in der Rollerflasche wachsen, bis sie eine Dichte von 300000 Zellen pro ml erreichen. Bei dieser Zelldichte stoppt die Proliferation der Zellen. Die Produktion von mAK geht jedoch noch weiter und die Rollerflasche wird deshalb noch einen Tag kultiviert. Durch Abzentrifugieren der Suspension gewinnt man den zellfreien mAK-haltigen Kulturüberstand. Die erfindungsgemäßen mAK können je nach Verwendungszweck in diesem ungereinigten Überstand oder nach einer Reinigung verwendet werden.

Der zellfreie, mAK-haltige Kulturüberstand wird über eine Tangentialdruckanlage mit einer Filterfläche von 260 cm² und einer Ausschlußgrenze von 30 kD auf 1/20 konzentriert. Der pH-Wert des Konzentrates wird mit 1 M NaOH-Lösung auf 4,7 eingestellt und dann das Konzentrat auf eine Protein-G-Sepharose-Säule mit einem Gelvolumen von 10 ml aufgetragen. Danach muß die Säule mit 0,02 M NaH₂PO₄ x H₂O mit dem pH 7,0 gewaschen werden. Der mAK wird mit 0,1 M Glyzinpuffer mit dem pH 2,7 eluiert, durch eine Dialysemembran gegen PBS mit dem pH 7,4 umgepuffert und auf seine Reinheit elektrophoretisch (SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach Swank R. T. und Munkres K. D., Anal. Biochem. 39, 462, 1971) untersucht. Die Konzentration des mAK's wird durch UV-Absorption bei 280 nm bestimmt. Die Verwendung von Protein-G hat gegenüber Protein-A zwei Vorteile. Zum einen werden die murinen Antikörper durch Protein-G wesentlich besser gebunden als durch Protein-A. Zum anderen bindet Protein-G bei pH 4,7 zwar die murinen Antikörper, nicht jedoch die bovinen, die durch Zugabe von FKS ins KulturmEDIUM gelangen. Je nach FKS-Charge liegen diese im KulturmEDIUM zwischen 10 und 200 mg/ml vor. Bei der Reinigung über Protein-A ist es nicht möglich, diese unspezifischen bovinen Antikörper von den gewünschten murinen anti-hIL-10-mAK zu trennen.

Die in der Erfindung beschriebenen mAK können nach der Methode von Wilson und Nakane (Immunologische Arbeitsmethoden, G. Fischer, 1984) mit der Peroxidase aus Meerrettich markiert werden. Im ersten Schritt werden durch Oxidation mit Natriumperodat Aldehydgruppen im Kohlenhydratanteil der Peroxidase erzeugt. Im dem nächsten bilden diese mit den Aminogruppen des mAK's Schiff'sche Basen aus, aus denen nach Reduktion mit Natriumborhydrid stabile Bindungen (stabile sekundäre Amine) erzeugt werden. Eine Eigenvernetzung der Peroxidase findet praktisch nicht statt, da diese nur wenige freie Aminogruppen besitzt und die Oxidation bei einem niedrigerem pH-Wert durchgeführt wird.

Aus den erfindungsgemäßen mAK können die monoklonalen murinen Fab-Fragmente hergestellt werden. Das geschieht durch die proteolytische Einwirkung von Papain unter leicht reduzierenden Bedingungen. Die Konzentration der mAK wird auf 1,3 mg/ml eingestellt. Dazu wird EDTA bis zur Endkonzentration von 2 mM zugegeben. Zu dieser Lösung wird Cystein (Endkonzentration 10 mM) gegeben. Anschließend wird diese Lösung sofort mit Papain versetzt. Das Verhältnis von Papain zu mAK beträgt 1:10 (w : w). Nach 65 Minuten Inkubation bei 37°C wird zur Lösung Iodessigsäure bis zur Endkonzentration von 25 mM gegeben. Die Rolle des Cysteins bei der Spaltung von murinen IgG mit Papain besteht nicht nur in der Aktivierung des Papains, sondern auch in der Reduktion der Disulfidbrücken zwischen den g-Ketten. Die Endkonzentration von 10 mM ist essentiell für diese Spaltung: ist sie niedriger, entstehen Fab₂-Fragmente; ist sie höher, werden die Disulfidbrücken zwischen der leichten (L) und der schweren (H) Kette gelöst. Diese Spaltungsbedingungen wurden für die erfindungsgemäßen mAK als die günstigsten unter verschiedenen getesteten (von 0,1 mM bis 20 mM Cystein, von 1:200 bis 1:10 w:w Papain zu dem mAK) ermittelt. Die höhere Konzentration von Papain als bei anderen Protokollen (Immunologische Arbeitsmethoden, G. Fischer, 1984; Monoklonale Antikörper, Springer Verlag, 1988) bewirkt die schnellere und effektivere Spaltung - durch kürzere Zeit für die Reduktion der Disulfidbrücken zwischen der L- und der H-Kette. Die erfolgte Fragmentierung des mAK's wird durch eine SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese überprüft. Die Fab-Fragmente können sofort nach der Spaltung oder erst nach Aufreinigung mit der Anionenaustausch-Chromatographie oder mit der Protein-A-Sepharose-Säule (Monoklonale Antikörper, Springer Verlag, 1988) verwendet werden.

Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen humanes Interleukin-10

Beispiel 4

Reaktion der monoklonalen Antikörper mit humanem Interleukin-10 in dem im Beispiel 1 beschriebenen ELISA und im Western-Immunoblot

Es wird eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von hIL-10 durchgeführt. Die Proteinbanden werden nach Kyhse-Andersen (Biochem Biophys. Methods 10, 203, 1984) auf Nitrozellulosefolie übertragen. Die Folie wird mit Verdünnungspuffer über 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt, danach 3 mal in Waschpuffer gewaschen und anschließend mit den jeweiligen mAK (10 mg/ml) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3 Waschschritten wird sie für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus-IgG-Peroxidasekonjugat) inkubiert. Danach wird die Nitrozellulosefolie wieder 3 mal gewaschen und mit einem Peroxidasesubstrat (0,1 M Tris mit dem pH 7,57; 1,2 mM DAB; 0,1% v:w NiCl₂) behandelt. Im positiven Falle, wenn der untersuchte mAK an das an der Folie immobilisierte Protein bindet, kommt es zur Farbreaktion. Im so durchgeführten Western-Immunoblot erkennen 15 in der Erfindung beschriebene mAK die gleiche Proteinbande in dem erwarteten Molekulargewichtsbereich von hIL-10.

Die erfindungsgemäßen mAK binden an hIL-10 auch in dem im Beispiel 1 beschriebenen ELISA (ELISA-B.1). Die Ergebnisse des Testes sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt:

Tabelle 1

	1.	2.	3.	4.	5.
A:					
CB/RS/1E4	0,6 76	1,5 34	1,2 71	1,0 6	0,0 2
CB/RS/3H4	0,6 71	1,6 09	1,5 63	1,0 9	0,0 2
CB/RS/8B12	0,8 34	1,3 93	0,6 80	0,9 5	0,1 0

08.10.95

B: CB/RS/5C8	0,4 15	1,0 56	1,7 43	0,5 7	1,0 2
CB/RS/6D11	0,4 61	0,8 69	0,8 72	0,5 9	0,6 3
CB/RS/5E2	0,2 17	0,4 95	1,3 35	0,5 3	0,6 7
CB/RS/6D10	0,2 35	0,6 60	1,9 85	0,5 5	0,8 3
CB/RS/8B3	0,5 03	0,9 74	0,8 56	0,6 0	0,7 0
CB/RS/7F8	0,4 39	0,8 72	0,6 00	0,5 4	0,9 1
CB/RS/8F7	0,3 28	0,7 25	1,2 43	0,7 0	1,0 9
C: CB/RS/7G5	0,7 73	1,1 24	0,5 08	0,5 9	1,4 8
CB/RS/7H4	0,7 05	1,0 27	0,4 04	0,5 0	1,6 6
D: CB/RS/6F6	1,0 15	1,5 08	0,5 16	0,7 8	0,3 5
E: CB/RS/5H7	0,0 55	0,8 65	-	-	-
F: CB/RS/8A7	0,1 09	0,1 40	-	0,7 6	0,3 3

1. Der OD-Wert (der Wert der optischen Dichte) bei Konzentration des mAK's 1mg/ml gemessen im ELISA-B.1.
2. Maximaler OD-Wert gemessen im ELISA-B.1.
3. Die Halbsättigungskonzentration des mAK's in mg/ml ermittelt mit dem ELISA-B.1.
4. Verhältnis der Menge, des nach 1 Stunde Inkubation an hIL-10 beschichtete Plastikplatten gebundenen mAK's (1mg/ml) zu der Menge dieses mAK's, die an gleichen Platten, aber nach 2 Stunden Inkubation gebunden wurde, ermittelt in ELISA-B.1.
5. hIL-10 Hemmversuch. Untersucher mAK (1 µg/ml) wurde mit 0,2 mg/ml hIL-10 1 Stunde bei Raumtemperatur Vorinkubation gebundenen mAK ermittelt. In der Tabelle 1 ist dargestellt das Verhältnis dieser Menge zu der Menge des gleichen mAK (1 µg/ml), die ohne vorherige Inkubation mit hIL-10 an mit diesem Zytokin beschichtete Platten bindet.

Beispiel 5

Bestimmung der Reaktivität mit anderen Antigenen, des Isotyps und der leichten Ketten der monoklonalen Antikörper

Die erfindungsgemäßen mAK werden auf ihre Reaktivität mit anderen Antigenen als hIL-10 getestet. Die Untersuchung wird mit mehreren selbst entwickelten ELISA's vorgenommen. Sie verläuft wie im Beispiel 1 beschrieben. Lediglich das für die Beschichtung der Platten verwendete Antigen wird variiert. Es wurden hIL-2, hIL-6, hIFN-γ, hTNF-α, Tetanustoxin, Diphtherietoxin, humanes Kollagen Typ 2, Lipopolisaccharid (LPS) von *Pseudomonas aeruginosa* Srotyp 10, LPS von *Klebsiella pneumoniae*, Lipid

A von E. coli und k Casein mit Konzentration je nach Antigen zwischen 1 mg/ml und 40 mg/ml in 0,1 M Carbonat / Bicarbonatpuffer mit dem pH 9,8 an der Plastikplatte adsorbiert. Die mAK der Gruppen A, B, C, D, F binden in solchen Tests an keines der Antigene. Der mAK CH/RS/5H7 (Gruppe E) erkennt in diesen ELISA hIFN-g und hTNF-a. Um die nicht spezifische Reaktivität der mAK mit dem Plastikmaterial der Platten auszuschließen, wird für alle Platten eine Negativkontrolle gemessen, bei der die Platten anstatt mit oben erwähnten Antigenen nur mit 1%igem Rinder-Albumin in ELISA-Puffer inkubiert werden.

Mit dem Mouse-Hybridoma-Subtyping wurde gezeigt, daß die mAK der Gruppen A, B, C, F zur Subklasse IgG1, die mAK der Gruppen D und E zur Klasse IgM gehören und die mAK aller Gruppen leichte Ketten des Typs Kappa besitzen.

Beispiel 6

Analytische Polyacrylamidgel-Isoelektrische-Fokussierung (PAG-IEF) von monoklonalen Antikörpern

Die Durchführung von PAG-IEF erfolgt mittels Phast-SystemTM (Pharmacia, Schweden). Es wurden 5 %ige PhastGelsTM mit einem pH-Gradienten von pH 3,0 - 9,0 genutzt. Die untersuchten mAK werden 60 Minuten mit einer Spannung von 200 V bei 15°C fokussiert. Zum Nachweis der Proteinbanden wird die Silbernitratfärbemethode durchgeführt. Die Proteine werden am Gel in 20%iger Trichloressigsäure fixiert, mit einem Gemisch aus Ethanol / Essigsäure / Wasser (1/0,5//8,5) und nachfolgend mit 8%iger Glutaraldehydlösung inkubiert. Nach wiederholtem Waschen des Gels mit Ethanol / Essigsäure / Wasser (1/0,5//8,5) wird es in 0,5%iger Silbernitratlösung inkubiert und die Farbreaktion mit 2,5%iger Natriumcarbonatlösung mit pH 10,5 entwickelt. Die Gele werden vor dem Lufttrocknen mit 5%iger Glycerollösung konserviert. Die 15 erfindungsgemäßen mAK zeigen für jeden dieser mAK ein charakteristisches Muster aus mehreren Banden. Diese Mikroheterogenität beruht vermutlich auf unterschiedlicher Glykosylierung (bei identischer Aminosäuresequenz) oder auf posttranslationalen Modifikationen.

Beispiel 7

Ermittlung der Affinitätskonstanten

Die Affinitätskonstanten ($K_A=1/K_D$) der erfindungsgemäßen mAK zu hIL-10 werden nach der Methode von Friguet et al. (1985, J. Immunol. M. 77:305) bestimmt. Die mAK werden mit Verdünnungspuffer auf die erwünschten Konzentrationen (je nach mAK zwischen 0,4 µg/ml und 3,0 µg/ml) verdünnt und mit fallender hIL-10-Konzentration (von 5 µg/ml bis 0,05 µg/ml) zur Einstellung des Gleichgewichtszustandes über 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Bestimmung des freien, an dem hIL-10 nicht gebundenen mAK (mAK_f) mit dem im Beispiel 1 beschriebenen ELISA, indem 50 µl des Inkubationsgemisches in die Kavitäten der ELISA-Platte überführt und 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nach Entfernung der ungebundenen Reaktanten erfolgte die Quantifizierung des gebundenen mAK mit Hilfe entsprechenden Konjugates. Die Berechnung des K_D -Wertes basiert auf dem linearen Zusammenhang zwischen Absorption (Enzymaktivität im ELISA) und Konzentration des an den mit hIL-10 beschichteten Plastikplatten gebundenen mAK, welche der Konzentration des mAK_f gleich ist. Unter der Voraussetzung, daß die Konzentration von totalem mAK, totalem hIL-10 und von dem mAK_f bekannt sind, ist es möglich, mit dem Programm CBEIA_C (Glaser R W., 1993, J. Immunol. Methods 179:265) den K_D -Wert zu ermitteln (Tabelle 2).

Tabelle 2

	K_D -Wert
A: CB/RS/1E4	$<1,1^* \cdot 10^{-10}$
CB/RS/3H4	$<1,7^* \cdot 10^{-10}$
CB/RS/8B12	$<2,1^* \cdot 10^{-11}$
B: CB/RS/5C8	$4,7^* \cdot 10^{-8}$

8.26.10.95

CB/RS/6D11	8,8*10 ⁻⁹
CB/RS/5E2	1,6*10 ⁻⁷
CB/RS/6D10	1,8*10 ⁻⁷
CB/RS/8B3	3,6*10 ⁻⁸
CB/RS/7F8	1,5*10 ⁻⁸
CB/RS/8F7	6,0*10 ⁻⁸
C: CB/RS/7G5	2,1*10 ⁻⁷
CB/RS/7H4	3,0*10 ⁻⁸
D: CB/RS/6F6	2,7*10 ⁻⁸
E: CB/RS/5H7	n.d.
F: CB/RS/8A7	1,4*10 ⁻⁷

n.d. - Die Messung erfolgte nicht.

Beispiel 8

Charakterisierung der Epitope des humanen Interleukin-10, an die die monoklonalen Antikörper binden und Auswirkung dieser Bindung

Die Bindung der erfindungsgemäßen mAK an hIL-10 wurde auch mit BIAliteTM (Pharmacia Biosensor AB) untersucht. Dabei werden 2 unterschiedliche Methoden verwendet. Bei der Methode 1. wird das hIL-10 kovalent am Sensor Chip (Pharmacia Biosensor AB) gebunden. Bei der Messung fließt über dem Chip Lösung mit untersuchtem mAK. Wenn der mAK an den immobilisierten hIL-10 gebunden wird, kommt es zur Veränderung des Reflektionswinkels des Lichtes, mit welchem das Sensor Chip bestrahlt wird. Die Winkeländerung (RU) entspricht der Menge des Chip-gebundenen Proteins (1 RU = 10⁻⁹ kg/m²). Die Auswertung erfolgt mit dem Programm BIAevaluation 2.0 (Pharmacia Biosensor AB). Von den 15 erfindungsgemäßen mAK erkennen das immobilisierte hIL-10 im solchen Testsystem 12 verschiedene mAK. Nach der Immobilisierung von 400 RU hIL-10 an dem Sensor Chip wird für jeden der 12 mAK (mAK₁) die Menge (RU₁) des mAK₁ ermittelt, die während 100s bei 3 µl/min Fließgeschwindigkeit der Antikörperlösung aus dieser Lösung an dem Chip gebunden wird. Danach wird der an hIL-10 gebundene mAK₁ mit 1 M Glyzinpuffer mit pH 2,7 vor dem Sensor Chip eluiert und ein anderer mAK (mAK₂) so lange auf dieses Chip gegeben, bis er an alle für ihn zugänglichen Epitope des Zytokins gebunden wird und keine Veränderungen des Reflektionswinkels mehr meßbar sind. Anschließend wird die Menge (RU₂) des mAK₁ gemessen, die jetzt während gleicher Zeit, bei gleicher Fließgeschwindigkeit der Antikörperlösung am Zytokin bindet. Wenn das Verhältnis RU₁ zu RU₂ größer als 0,60 ist, erkennt der mAK₁ ein Epitop, das räumlich getrennt von dem Epitop des mAK₂ liegt. Ist das Verhältnis größer als 1,2 bewirkt der mAK₂ eine Konformationsänderung des hIL-10 mit

gleichzeitiger verstärkter Präsentation des Epitops, an das der mAK₁ bindet. Wenn die beiden mAK das gleiche Epitop erkennen, ist das Verhältnis unter 0,25. Die Ergebnisse der Testung nach der Methode-1, sind in der Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3

	mAK 1: 1E4	mAK 1: 3H4	mAK 1: 8B12	mAK 1: 5C8	mAK 1: 7F8	mAK 1: 8B3	mAK 1: 7G5
mAK 2: 1E4	0	2	5	101	92	93	n.d.
mAK 2: 3H4	3	0	2	120	112	104	n.d.
mAK 2: 5C8	89	86	92	0	16	19	n.d.
mAK 2: 5E2	110	87	65	1	10	7	n.d.
mAK 2:6D1 0	91	94	73	4	4	13	n.d.
mAK 2:6D1 1	80	73	100	2	10	2	n.d.
mAK 2: 7F8	86	62	79	1	0	24	131
mAK 2: 7G5	562	687	619	125	156	167	0
mAK 2: 7H4	502	635	601	131	148	177	7
mAK 2: 8B3	158	206	186	4	11	0	129
mAK 2:8B1 2	5	1	0	98	108	94	n.d.
mAK 2:8F7	82	64	78	1	19	20	n.d.

n.d. - Die Messung erfolgte nicht.

Die 12 mAK, welche im oben beschriebenen Testsystem mit immobilisiertem hIL-10 reagieren, werden in 3 Gruppen: A, B, C eingeteilt.

A: CB/RS/1E4, CB/RS/3H4, CB/RS/8B12

B: CB/RS/5C8, CB/RS/5E2, CB/RS/6D10, CB/RS/6D11,
CB/RS/7F8, CB/RS/8B3, CB/RS/8F7

C: CB/RS/7G5, CB/RS/7H4

Die mAK innerhalb einer Gruppe binden an das gleiche, für diese Gruppe charakteristische Epitop des hIL-10, welches räumlich getrennt von den Epitopen der anderen Gruppen ist. Die Bindung eines mAK aus der Gruppe A am hIL-10 bewirkt die Konformationsänderung des Zytokins. Gleichzeitig werden andere Epitope besser oder schlechter präsentiert, was die Geschwindigkeit verändert, mit welcher diese Epitope durch andere Peptide erkannt werden (z.B. mAK aus der Gruppe C bindet an hIL-10 bis 700% schneller, wenn daran bereits ein mAK aus der Gruppe A gebunden ist). Die Eigenschaft, die Konformation von hIL-10 zu ändern, besitzen auch die mAK aus der Gruppe B; wenn ein mAK aus

dieser Gruppe am hIL-10 gebunden wird, erkennen die mAK der Gruppe C das Zytokin bis 177% schneller.

Solche Effekte sind bei Zytokinen bis jetzt noch nicht beschrieben worden. Sie können in der Zukunft die größte Bedeutung für die Modulation der Zytokin-Wirkung in vivo und in vitro haben. Die Konformationsänderung des Zytokins mit gleichzeitiger besserer oder schlechterer Präsentation von verschiedenen Epitopen bewirkt, daß diese Epitope durch Peptide schneller oder langsamer erkannt werden und die Bindung zwischen dem Zytokin und dem Peptid stabiler oder instabiler wird. Das muß Einfluß auf die biologische Wirkung dieses Zytokins haben - sie verstärken oder abschwächen. Die Anwendung von Verbindungen, die solche Konformationsänderung auslösen, wird die biologische Aktivität von Zytokinen lokal in die erwünschte Richtung ändern, ohne gleichzeitiges Auftreten von systemischen Nebenwirkungen.

Die Einteilung der oben erwähnten 12 mAK in 3 Gruppen wurde durch den Test nach der Methode 2. bestätigt. Dabei wird an dem Sensor Chip ein Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper immobilisiert und einer der 12 mAK (mAK₁) so lange auf das Chip gegeben, bis keine mehr Veränderungen von RU nachweisbar sind. Die immer noch freien Bindungsstellen der anti-Maus-IgG-Antikörper werden mit einem murinen, polyklonalen Immunglobulinalgemisch besetzt. Danach wird hIL-10 (10 µg/ml) so lange hinzugegeben, bis keine Veränderungen des Reflektionswinkels gemessen werden. Anschließend ermittelt man die Menge von jedem der 12 mAK (mAK₂), die während 100 s bei 5 µl/min Fließgeschwindigkeit der Antikörperlösung aus dieser Lösung an den Sensor-Chip gebunden wird. Wenn diese Menge signifikant ist, erkennt der mAK₂ ein Epitop, welches räumlich getrennt von dem Epitop des mAK₁ liegt. Die Ergebnisse dieses Tests sind am Beispiel eines mAK's aus jeder Gruppe in der Tabelle 4 dargestellt:

Tabelle 4.

	1	2	3
	.	.	.
Als mAK ₁ : CB/RS/3H4 (Gruppe A)	- 2	6 0	8 9
Als mAK ₁ : CB/RS/5C8 (Gruppe B)	2 2	- 3	1 7
Als mAK ₁ : CB/RS/7G5 (Gruppe C)	2 8	6 9	1

1. Menge in RU des als mAK₂ gegebenen, am hIL-10 gebundenen CB/RS/1E4 (Gruppe A)
2. Menge in RU des als mAK₂ gegebenen, am hIL-10 gebundenen CB/RS/5C8 (Gruppe B)
3. Menge in RU des als mAK₂ gegebenen, am hIL-10 gebundenen CB/RS/7G5 (Gruppe C)

Zur Charakterisierung der Epitope, an welche der mAK CB/RS/6F6 und der mAK CB/RS/5H7 binden, wurde ein Epitopen-ELISA entwickelt. Die 96 Well-Platten werden mit jedem dieser mAK (10 µg/ml), wie im Beispiel 1 beschrieben, beschichtet. Die 15 mAK (Konzentration zwischen 0,5 µg/ml und 3 µg/ml) werden über 24 Stunden mit 0,2 µg/ml hIL-10 bei 4°C inkubiert. Danach wird dieses Inkubationsgemisch auf die mit CB/SR/6F6 und auf die mit CB/RS/5H7 beschichteten Platten für 2 Stunden übertragen. Nach 4 Waschschritten gibt man bei IgG-Antikörper als sekundären Antikörper ein Ziege-anti-Maus-IgG-Peroxidasekonjugat, bei IgM-Antikörper ein Ziege-anti-Maus-IgM-Peroxidasekonjugat. Es folgen, wie im Beispiel 1 beschrieben, 4 Waschschrritte und die Zugabe von Peroxidasesubstrat und Stopplösung. Im positiven Falle, wenn der an der Plastikplatte adsorbierte mAK und der mit hIL-10 vorinkubierte mAK räumlich getrennte Epitope des Zytokins erkennen, kommt es zur Farbreaktion. Als Negativkontrolle wird die Lösung des entsprechenden mAK ohne hIL-10 verwendet. Die in diesem Test gemessene OD-Werte sind am Beispiel eines mAK's aus jeder Gruppe in der Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5

	1.	2.	3.	4.
CB/RS/8B12 (Gruppe A)	0,8 28	0,1 79	0,1 87	0,0 84
CB/RS/7F8 (Gruppe B)	0,1 49	0,1 24	0,1 73	0,1 30

CB/RS/7G5 (Gruppe C)	0,4 06	0,1 82	0,1 94	0,1 40
CB/RS/6F6 (Gruppe D)	0,1 33	0,1 15	0,1 67	0,1 25
CB/RS/5H7 (Gruppe E)	0,2 61	0,1 93	0,1 05	0,0 98
CB/RS/8A7 (Gruppe F)	0,2 69	0,1 75	0,1 88	0,1 15

1. OD-Wert der Lösung des entsprechenden mAK mit hIL-10, gemessen in den mit CB/RS/6F6 beschichteten Platten
2. OD-Wert der Lösung des entsprechenden mAK, gemessen in den mit CB/RS/6F6 beschichteten Platten
3. OD-Wert der Lösung des entsprechenden mAK mit hIL-10, gemessen in den mit CB/RS/5H7 beschichteten Platten
4. OD-Wert der Lösung des entsprechenden mAK, gemessen in den mit CB/RS/5H7 beschichteten Platten

Mit diesem Test wird gezeigt, daß die mAK CB/RS/6F6 und CB/RS/5H7 zwei Epitope erkennen, welche räumlich getrennt von den Epitopen der Gruppen A, B, und C lokalisiert sind. Diese mAK werden in zwei neue Gruppen D und E eingeteilt:

D: CB/RS/6F6

E: CB/RS/5H7.

Der mAK CB/RS/8A7 bindet an ein Epitop, welches räumlich getrennt von den Epitopen der Gruppen D und E liegt. Deswegen wurde CB/RS/8A7 in eine neue Gruppe F eingeteilt:

F: CB/RS/8A7.

Beispiel 9

Einfluß der monoklonalen Antikörper auf die biologische Aktivität des humanen Interleukin-10

Der Einfluß der mAK auf die biologische Aktivität des hIL-10 wird in einem selbst entwickelten Testsystem mit mononukleären Zellen bestimmt. Diese Zellen sind in der Lage, nach Stimulation mit LPS TNF-a zu synthetisieren und zu sezernieren. Das hIL-10 hemmt die beiden Prozesse. Der untersuchte mAK (mit fallender Endkonzentration von 50 µg/ml bis 0,0 µg/ml) wird mit hIL-10 (Endkonzentration 300 pg/ml) gemischt und 12 Stunden bei 37°C vorinkubiert. Die für den Test benötigten Zellen werden aus heparinisiertem Venenblut gewonnen, welches unter sterilen Bedingungen entnommen und mit PBS 1:1 gemischt wird. 10 ml steriles Lymphozyten-Separationsmedium wird in 50 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt und mit 20 ml Blut-PBS-Gemisch vorsichtig überschichtet. Nach der Zentrifugation werden die ringförmige Zwischenschicht mit den mononukleären Zellen entnommen und die Zellen mit Basismedium 3 mal gewaschen. Danach werden sie mit LPS-freiem Kulturmedium auf 10⁶ Zellen pro ml verdünnt, mit LPS (Endkonzentration 100 pg/ml) und mit der 12 Stunden vorinkubierten Lösung gemischt und über 4 Stunden in feuchter 5%iger CO₂-Atmosphäre bei 37°C kultiviert. Das Verhältnis der TNF-a Konzentration im Zellüberstand (ZÜ) der Proben mit mAK zu der TNF-a Konzentration im ZÜ der Proben, in denen die mAK - Konzentration 0,0 µg/ml beträgt, beschreibt den Einfluß des untersuchten mAK auf die biologische Aktivität des hIL-10. Die biologische Aktivität des hIL-10 wird inhibiert, wenn das Verhältnis größer 1,25 beträgt. Sind die TNF-a Konzentrationen in den beiden Proben gleich, hat der untersuchte mAK keinen signifikanten Einfluß auf die Wirkung dieses Zytokins.

In der Tabelle 5 sind die Konzentrationen der erfindungsgemäßen mAK (in M/l) dargestellt, bei welchen die biologische Aktivität des hIL-10 um 50% vermindert ist.

Tabelle 5

	ID50
A: CB/RS/1E4	$7,3 \cdot 10^{-12}$
CB/RS/3H4	$8,6 \cdot 10^{-12}$
CB/RS/8B12	$8,5 \cdot 10^{-12}$
B: CB/RS/5C8	$3,2 \cdot 10^{-8}$
CB/RS/6D11	$3,4 \cdot 10^{-8}$
CB/RS/5E2	n.d.
CB/RS/6D10	$4,8 \cdot 10^{-8}$
CB/RS/8B3	$2,8 \cdot 10^{-8}$
CB/RS/7F8	$9,2 \cdot 10^{-9}$
CB/RS/8F7	$6,5 \cdot 10^{-8}$
C: CB/RS/7G5	n.d.
CB/RS/7H4	n.d.
D: CB/RS/6F6	$7,9 \cdot 10^{-9}$
E: CB/RS/5H7	n.d.
F: CB/RS/8A7	$2,0 \cdot 10^{-8}$

n.d. - Die Messung erfolgte nicht.

Schutzansprüche

1. Monoklonale Antikörper, die gegen humanes Interleukin-10 gerichtet sind (a-IL-10-mAK).
2. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 1, die durch Hybridom-Zelllinien produziert werden.
3. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 1 und 2, erhältlich aus Hybridom-Zelllinien, die durch Verschmelzung der Milzzellen von mit humanem Interleukin-10 immunisierten Mäusen mit murinen Myelomzellen entstehen und nachfolgend die a-hIL-10-mAK produzierenden Klone isoliert und vermehrt werden.
4. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 1 bis 3, gekennzeichnet durch die Inhibierung der biologischen Aktivität des humanen Interleukin-10 nach Bindung dieser mAK an das Zytokin.
5. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 1 bis 3, gekennzeichnet durch die Stabilisierung von hIL-10 und die Verlängerung der biologischen Halbwertszeit des hIL-10 nach Bindung dieser mAK an das Zytokin.
6. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß die Bindung dieser mAK an humanes Interleukin-10 die Konformation dieses Zytokins ändert.
7. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß die Bindung dieser mAK an humanes Interleukin-10 mit dessen Konformationsänderung und mit einer gleichzeitigen besseren oder schlechteren Präsentation von verschiedenen Epitopen dieses Zytokins einhergeht und wodurch hIL-10 durch Proteine / Peptide schneller oder langsamer erkannt wird und die biologische Wirkung von hIL-10 verstärkt oder abgeschwächt wird.
8. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 1 bis 7, gekennzeichnet dadurch, daß mAK der Gruppen A bis F innerhalb einer Gruppe und das gleiche, für diese Gruppe charakteristische Epitop des hIL-10 binden, welches räumlich von den Epitopen der anderen Gruppen getrennt ist und wobei mAK
 - der Gruppen A und B eine Konformationsänderung des Zytokins bewirken mit dem Ergebnis, daß andere Epitope des hIL-10 besser oder schlechter präsentiert werden und dadurch die Geschwindigkeit verändert wird, mit der diese Epitope durch andere Proteine / Peptide erkannt werden
 - der Gruppe C das Zytokin schneller erkennen, wenn ein mAK der Gruppe A oder B an das Zytokin gebunden wird
 - der Gruppen D und E, die zwei Epitope erkennen, welche räumlich getrennt von den Epitopen der Gruppen A, B und C lokalisiert sind
 - der Gruppe F, die an ein Epitop binden, das räumlich getrennt von den Epitopen der Gruppen D und E liegt.
9. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 1 bis 7, gekennzeichnet dadurch, daß Chimäre dieser mAK im konstanten Teil aus humanem Ig und im variablen, insbesondere im hypervariablen Teil aus den beanspruchten monoklonalen Antikörpern gegen humanes Interleukin-10 bestehen.
10. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 1 bis 7, gekennzeichnet dadurch, daß Fab-Fragmente dieser mAK durch proteolytische Einwirkung von Papain auf die monoklonalen Antikörper gegen humanes Interleukin-10 entstehen.
11. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 1 bis 7, gekennzeichnet dadurch, daß Konjugate dieser mAK aus magnetischen Beads, radioaktiven Substanzen, Arzneimitteln, fluoreszierenden oder farbbildenden Substanzen und aus den beanspruchten monoklonalen Antikörpern gegen humanes Interleukin-10 bestehen oder die beanspruchten monoklonalen Antikörper gegen humanes Interleukin-10, ihre Chimären oder Fab-Fragmente in Liposome eingekapselt sind.
12. Arzneimittel zur Behandlung, Diagnose und Prophylaxe von Interleukin-10-abhängigen Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Wirkstoffe die monoklonalen Antikörper nach Anspruch 1 bis 8, ihre Chimären, Fab-Fragmente oder Konjugate nach Anspruch 9 bis 11 enthalten.
13. Hybridom-Zelllinien nach Anspruch 2 und 3, gekennzeichnet dadurch, daß sie a-hIL-10-mAK produzieren.
14. Hybridom-Zelllinien nach Anspruch 2, 3 und 13, gekennzeichnet dadurch, daß sie durch Verschmelzung von Milzzellen der mit hIL-10 immunisierten Mäuse mit murinen Myelomzellen entstehen und danach die a-hIL-10-mAK produzierenden Klone isoliert und vermehrt werden.
15. Hybridom-Zelllinien nach Anspruch 2, 3, 13 und 14, gekennzeichnet dadurch, daß Klone isoliert und vermehrt werden, die Immunglobulin-Klassen IgA, IgD, IgE, IgM oder IgG-Subklassen IgG1, IgG2, IgG3 bzw. IgG4 produzieren.
16. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum Nachweis mAK gegen hIL-10, ihrer Chimären, Konjugate und Fab-Fragmente, dadurch gekennzeichnet, daß 96-Well-Platten mit hIL-10 beschichtet, mit Rinder-Albumin im ELISA-Puffer geblockt, mit Waschpuffer gewaschen und so gelagert werden und die zu testenden Proben in den Wells inkubiert, danach gewaschen, mit anti-Mausimmunglobulin-

B 25.10.95

Peroxidase-gekoppelten-Antikörpern inkubiert, mit Waschpuffer gewaschen, die Wells mit Peroxidasesubstrat gefüllt, die enzymatische Reaktion mit Stopplösung beendet und die Absorption in einem Photometer gemessen wird.

17. Testbesteck zur Bestimmung der a-hIL-10-mAK, ihrer Fab-Fragmente, Chimären oder Konjugate, bestehend aus a) 96-Well-Platten, b) hIL-10-Lösung in Carbonat- / Bicarbonatpuffer, c) Rinder-Albumin-Lösung, d) ELISA-Puffer aus Na-Phosphat und NaCl mit pH 7,4, e) Waschpuffer aus ELISA-Puffer und Tween 20, f) anti-Mausimmunglobulin-Peroxidase-gekoppelter-Antikörper-Lösung, g) Peroxidasesubstrat-Lösung aus Orthophenodiamin, H_2O_2 und Na-Citrat mit pH 5,0, h) Stopplösung aus Schwefelsäure und Na-Sulfit.